

Z. Klin. Chem. K.in. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 415—420

## Untersuchungen zur Methodik der immunologischen Lipoprotein-X (LP-X)-Bestimmung

Von W. PETEK, G. KOSTNER und A. HOLASEK

*Institut für Medizinische Biochemie der Universität Graz*

(Eingegangen am 28. Mai 1973)

In der vorliegenden Arbeit werden drei immunoelektrophoretische Methoden des Lipoprotein-X-Nachweises miteinander verglichen. Die einzelnen Techniken werden beschrieben und ihre Vor- und Nachteile aufgezeigt. Reproduzierbare Resultate sind nur mit einem Difco-Bacto-Agar als Trägermedium zu erhalten. Zusätzlich hat sich die Lagerung der vorgegossenen Agarplättchen in einer feuchten Kammer als günstig erwiesen. Da sich Apolipoprotein C-Peptide sowohl in normalen Serumlipoproteinen als auch im Lipoprotein-X finden, können in Abhängigkeit von der angewandten Technik im Serum Gesunder dem Apolipoprotein C entsprechende Präzipitationslinien auftreten, die Anlaß zu Fehlinterpretationen bieten. Die Auftropfmethode besitzt die größte Empfindlichkeit, bei ihr wird der Antikörper in Form eines Tropfens auf der kathodischen Seite aufgebracht. Da mit ihr wesentlich rascher ein Resultat erzielt werden kann, ist sie einer Modifikation der klassischen Immunoelektrophorese von SCHEIDEGGER überlegen. Nur in unklaren Fällen ist die zusätzliche Anwendung der modifizierten SCHEIDEGGER-Methode notwendig. Die Methode, bei der der Antikörper in ein rundes Loch auf der kathodischen Seite eingebracht wird, kann nicht empfohlen werden.

### *Investigation of methods for the immunological determination of lipoprotein-X (LP-X)*

In the present communication three immuno-electrophoretic methods for the detection of lipoprotein-X are compared. A detailed description of each method with their advantages and disadvantages is given. Reliable results could only be obtained by using Difco-Bacto-Agar. Ageing of the agar slides in a humid chamber prior to use proved advantageous. Since apolipoprotein C is found in normal serum lipoproteins as well as in lipoprotein-X similar lines of precipitation may occur in healthy serum depending on the technique employed, thereby giving rise to misinterpretation. The droplet procedure has the greatest sensitivity when the antibody is applied as a droplet on the cathode side. The rapidity with which results are obtained make it superior to the modification of the classical immunoelectrophoretic method of SCHEIDEGGER. The use of the modified SCHEIDEGGER method will prove necessary only on rare occasions. The method in which the antibody is added to the center well on the cathodical side is not recommended.

Die Diagnose des cholestatisch bedingten Ikterus ist oft nur mit Hilfe verschiedener Parameter möglich. Neben der Anamnese und dem klinischen Befund werden blutchemische, röntgenologische, bioptische und laparoskopische Methoden zur Klärung des Ikterus herangezogen. Einen festen Platz in der Differentialdiagnostik des Ikterus besitzen die Aktivitätsbestimmungen der Alkalischen Phosphatase, Leucinaminopeptidase und die der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. Auch kann aus der Aspartattransaminase-, Alanintransaminase- und Glutamatdehydrogenase-Aktivität im Serum eine Cholestase vermutet werden. Weiters werden noch Gerinnungsenzyme und Gerinnungsfaktoren zur Differentialdiagnose verwendet. Von JIRGL (1) wurde ein Mucoproteintest beschrieben, der bei mechanischem, nicht aber bei entzündlich bedingtem Ikterus in einem hohen Prozentsatz positiv sein soll. Das unterschiedliche Verhalten von Serumeisen und Serumkupfer sowie von Stoffwechselmetaboliten der Leber, wie freies Cholesterin und das der Phosphatide, kann zur Differenzierung der Ikterusformen ebenfalls gezielt eingesetzt werden. Allein die Vielzahl der empfohlenen Methoden ist schon Ausdruck dafür, daß der cholestatisch bedingte Ikterus oft nur erschwert von anderen Ikterusformen unterschieden werden kann. Ursache ist die differente Ätiologie, die dem cholestatischen Ikterus

zu Grunde liegt; denn je nach der Dauer und dem Ausmaß der primär oder sekundär bedingten Leberzellschädigung werden unterschiedliche Befunde erhoben. Die Aussage blutchemischer Untersuchungen ist aber gerade dann wertvoll, wenn durch den hohen Bilirubinspiegel röntgenologische Untersuchungen nicht angewendet werden können und bioptische oder laparoskopische Methoden wegen Störungen innerhalb der Blutgerinnung kontraindiziert sind.

Das Auftreten abnormer Lipoproteine bei cholestatischen Erkrankungen der Leber wurde bereits von KUNKEL und SLATER (2) und später von EDER und RUSS (3) beschrieben. PICARD (4), SWITZER (5) sowie SEIDEL und ALAUPOVIC (6) haben eines dieser abnormen Lipoproteine näher untersucht. Dieses bis dahin unbekannte Lipoprotein findet sich in der LDL (Low Density Lipoprotein) Flotationsklasse und wird von PICARD (4) als abnormes Lipoprotein oder auch spezifisches Cholestase Lipoprotein (SCLP) bezeichnet. Es wird auch Lipoprotein-X (LP-X) genannt und findet sich außer bei Patienten mit extra- oder intrahepatisch bedingter Cholestase (7) noch bei Patienten, die an einem genetisch bedingten Mangel an Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT-Deficiency) leiden (8). Die LCAT-Deficiency stellt eine äußerst selten auftretende Stoffwechselanomalie dar. Das Vorhanden-

sein eines LP-X im Patientenblut kann nicht nur mit Hilfe der Ultrazentrifuge, sondern wesentlich rationeller mit immunochemischen Methoden nachgewiesen werden. Der Nachweis oder das Fehlen des LP-X bedeutet ein wertvolles Kriterium in der Differentialdiagnostik des Ikterus (9). Es werden dadurch die Diagnose und Verlaufsbeobachtung von cholestatisch bedingten Erkrankungen der Leber vereinfacht.

Das LP-X stellt ein Lipoprotein dar, welches im Serum Gesunder nicht nachgewiesen werden kann. Normale Serumproteine und normale Apolipoproteine bilden unter pathologischen Bedingungen den Eiweißanteil des LP-X, der etwa 5% beträgt. Er setzt sich zum größten Teil aus Apolipoprotein C, welches Hauptbestandteil der Chylomikronen und VLDL (Very Low Density Lipoprotein) ist, aber auch im HDL (High Density Lipoprotein) vorkommt, geringen Mengen Apolipoprotein A und Albumin zusammen (4, 10). Der Lipidanteil (etwa 95%) besteht aus 66,5% Phosphatiden, 22,4% freiem Cholesterin, 2,4% verestertem Cholesterin und 2,9% Neutralfett (11). Aufgrund der Lipidzusammensetzung des LP-X ist anzunehmen, daß dieses der Träger der bei der Cholestase im Patientenblut vermehrt gefundenen Phospholipide und des freien Cholesterins ist.

Die Eiweißkomponente des LP-X ist immunogen und eignet sich zur Erzeugung eines präzipitierenden Antikörpers. Einer breiten Anwendung des LP-X-Nachweises stehen aber noch methodische Schwierigkeiten im Wege. Absolut LP-X-spezifische Antisera gibt es nicht. Die in Verwendung stehenden Antisera, die größtenteils Apolipoprotein C spezifisch sind, führen zu einer Kreuzreaktion mit den in VLDL und HDL vorkommenden Apolipoprotein-C-Peptiden, so daß eine einfache radiale Immunodiffusion zum LP-X-Nachweis nicht verwendet werden kann. Wegen der gemeinsamen Antigen determinante Apolipoprotein C treten auch bei der Immunoelktrophorese unter Verwendung von Agar als Trägermaterial Präzipitationslinien auf, die die sichere Abgrenzung des LP-X von den am Start verbleibenden VLDL erschweren können. In der vorliegenden Arbeit werden die verschiedenen Methoden des immunoelktrophoretischen LP-X-Nachweises untersucht und diskutiert.

## Material und Methoden

Die zur Untersuchung gelangten Serum- oder Plasmaproben stammten ausnahmslos von ikterischen Patienten. Alle Proben wurden nach 12–14 stündigem Fasten abgenommen. War ein sofortiges Aufarbeiten der Probe nicht möglich, so wurde sie nach einem Zusatz von 1 mg Natriumazid/ml Serum bei 4°C aufbewahrt. Die derart stabilisierte Serum- oder Plasmaprobe kann mindestens 14 Tage ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse aufbewahrt werden, weswegen sich diese Stabilisierung mit Natriumazid bei Versand der Probe empfiehlt.

### Versuchsdurchführung

Die Immunoelktrophorese wurde in einer von der Firma Gelman gelieferten Kammer und in verschiedenen anderen Elektrophoresekammern ausgeführt. Bei Verwendung der Gelmankammer wurden Kunststoffrahmen für jeweils 6 Objektträger verwendet.

Bei allen anderen Kammern konnten bis zu 8 Objektträger (2,5 × 7,5 cm), die mit je 3 ml Agargel beschichtet waren, gleichzeitig untersucht werden. Als Trägermaterial diente ausschließlich 1 proz. Difco-Bacto-Agar (Lot No 0140-01) in einem 0,05 mol/l Na-Veronal-Acetat-Puffer pH 8,6. Dieser Puffer, der auch als Elektrodenpuffer verwendet wurde, bestand aus 9,81 g Na-Veronal, 6,62 g Na-Acetat · 3 H<sub>2</sub>O und 60 ml 0,1 mol/l Salzsäure. Nach Auffüllen mit demineralisiertem Wasser auf 900 ml kann, wenn notwendig, der pH-Wert auf 8,6 justiert werden. Anschließend wird auf 1000 ml aufgefüllt. 100 µl Puffer werden mit 1 g Difco-Bacto-Agar vermischt und unter ständigem Rühren bis zur vollständigen Klärung erhitzt. Während des Abkühlens werden der Agarlösung 100 mg Natriumazid zugefügt. Nach dem Gießen müssen die Gele in einer feuchten Kammer für mindestens 6 h bei Raumtemperatur gelagert werden. Durch den Zusatz von Natriumazid in der angegebenen Konzentration und Lagerung bei Kühlschranktemperatur (+ 4°C) können die vorgegossenen Gele in einer feuchten Kammer bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Die elektrophoretische Trennung wurde bei einer konstanten Spannung und einer Feldstärke von 3–4 Volt/cm (im Gel gemessen) durchgeführt. Zur ausreichenden Trennung war eine Laufzeit von 60–80 min notwendig. Unter diesen Bedingungen zeigt das Albumin, das bei nicht ikterischen Seren durch Zusatz einer geringen Menge Bromphenolblau vorgefärbt werden kann, eine Wanderungstrecke von 12–15 mm anodwärts.

Es wurden drei bereits in der Literatur beschriebene immunoelktrophoretische Techniken (12, 13) für die vorliegende Untersuchung herangezogen. Die Methode 1 basiert auf der Standard-immunoelktrophoresetechnik nach SCHEIDEGGER (14) in der Mikromodifikation. Die zu untersuchenden Proben wurden in Löcher von 1,4 mm Durchmesser (entsprechend 3 µl) bzw. in solche von 2,2 mm Durchmesser (entsprechend 8 µl) eingefüllt. Der Abstand zwischen Antigenloch und Antiserumtrog betrug in beiden Fällen 2,5–3 mm. Der Antiserumtrog, symmetrisch zwischen beiden Antigenlöchern gelegen, hatte eine Länge von 2,5 cm und eine Breite von 1 mm.

Bei der Methode 2 wurde anstelle des Antiserumtroges ein Antiserumreservoir von 2,2 mm Durchmesser in einem Abstand von 4 mm auf der kathodischen Seite von je 2 Antigenlöchern gestanzt. Die notwendige Antiserummenge betrug 8 µl. Unter Verwendung dieser Technik können auf einem Objektträger insgesamt 6 Proben gleichzeitig untersucht werden.

Die Technik der Methode 3 erfordert lediglich das Stanzen der Antigenlöcher bis zu 6 pro Objektträger. Nach der elektrophoretischen Trennung werden 10–15 µl Antiserum kathodisch der Antigenlöcher direkt auf die Geloberfläche aufgetropft. Die Diffusion erfolgt bei allen 3 Methoden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

### Antisera

Antisera gegen LP-X wurden durch Immunisieren von Kaninchen, Schafen und Pferden hergestellt. Die Isolierung des zur Immunisierung verwendeten LP-X erfolgte nach SEIDEL (15). Das gereinigte LP-X wurde in einer Konzentration von 6 mg/ml zu gleichen Teilen mit komplettem FREUND'schen Adjuvans vermischt, emulgiert und den Tieren intraperitoneal appliziert. Etwa nach 3 Wochen konnte bei den Tieren ein Antikörper gegen LP-X festgestellt werden. Nach Erreichen eines genügend hohen Antikörpertiters wurden die Tiere anästhesiert und durch Entbluten getötet. Da bei wiederholten Immunisierungen sich auch Antikörper gegen Lipoprotein B, Albumin und IgG bilden können, wurden die Antikörper gegen Albumin und IgG durch Adsorption aus dem LP-X-Antiserum entfernt. Auf die Abtrennung der Antikörper gegen Lipoprotein B wurde verzichtet, da durch sie keine Störung bei den 3 angeführten Methoden zu erwarten ist. Bei allen drei Methoden können die Ergebnisse der Immunodiffusion leicht im Streulicht bewertet werden. Die Immunoelktrophorese kann auch nach 24-stündigem Waschen in isotoner NaCl-Lösung nach dem Trocknen mit lipophilen Farbstoffen oder mit Eiweißfarbstoffen angefärbt werden.

## Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der Immunoelktrophorese eines LP-X-positiven und eines LP-X-negativen Serums, das durch Anwendung der Methode 1 erhalten wurde. Unter den oben beschriebenen Laufbedingungen wandert das LP-X genügend weit kathodisch und trennt sich von den übrigen Lipoproteinen klar ab. Die auf der anodischen Seite sichtbaren Präzipitate sind größtenteils unspezifisch und sind bereits nach Beendigung der Elektrophorese sichtbar. Wahrscheinlich handelt es sich um Proteine, die durch die Schwefelsäurereste des Agars präzipitieren. LP-X-negative Sera mit einem erhöhten VLDL-Gehalt können die Anwesenheit eines LP-X vortäuschen. Die falsche Beurteilung kann dadurch entstehen, daß die am Start verbleibenden VLDL in das Gel eindiffundieren und zufolge der Kreuzreaktion mit Apolipoprotein C mit dem LP-X-Antiserum reagieren. Die Präzipitationslinie des LP-X und die der VLDL läßt sich durch ihr unterschiedliches Aussehen und ihre Lage voneinander unterscheiden. Durch die bei der Methode 1 angewandte Technik stellt sich die Präzipitationslinie des LP-X als eine entweder knapp unter der Auftragsstelle oder kathodisch davon beginnende ziemlich gerade verlaufende Linie dar, die dann am kathodischen Ende nach oben gebogen endet. Das nicht immer vorhandene VLDL-Präzipitationsband liegt nahe der Auftragsstelle (Abb. 2 Nr. 4), besitzt nie einen horizontal verlaufenden Anteil und verläuft, einen Bogen beschreibend, der Auftragsstelle parallel. Es ist trotzdem notwendig, ein sicher LP-X-negatives Serum gleichzeitig zu untersuchen, wodurch eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse gewährleistet ist. Eine Positivkontrolle bietet aus Gründen, die weiter unten diskutiert werden, kaum Vorteile. Die Methode 1 lieferte abhängig vom Titer des Antiserums bei hohem und mittlerem LP-X-Gehalt des untersuchten Serums klare und gut reproduzierbare Ergebnisse. Ist aber der LP-X-Gehalt einer Probe niedriger als 25 mg/100 ml Serum, so kann bei Verwendung dieser Technik ein im Serum vorhandenes LP-X meist nicht mehr eindeutig zur Darstellung gebracht werden.

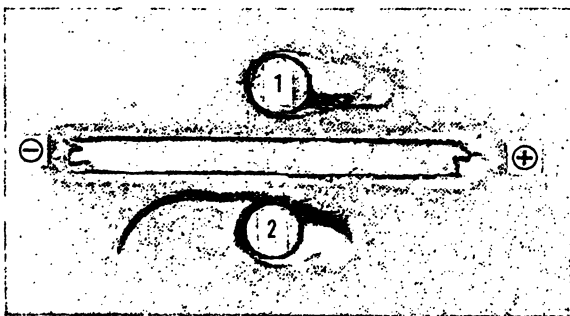


Abb. 1

Typisches Muster eines LP-X-positiven Serums und eines negativen Kontrollserums, erhalten mit Methode 1. 1: negatives Kontrollserum, 2: LP-X-positives Serum. Schlitz: Anti-LP-X-Serum, Färbung: Thiazinrot R.

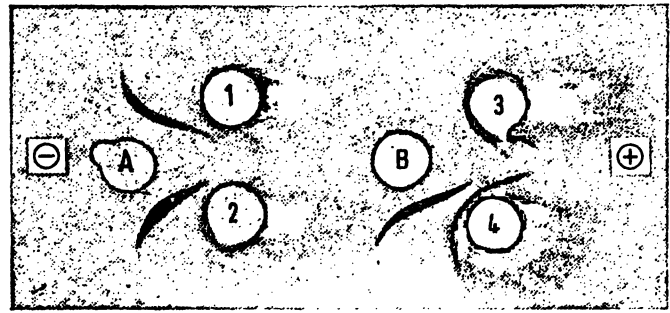


Abb. 2

Untersuchung verschiedener LP-X-positiver Sera sowie eines negativen Kontrollserums mit Hilfe der Methode 2. 1, 2, 4: LP-X-positive Sera, 3: LP-X-negatives Serum, A, B: Anti-LP-X, Färbung: Sudanschwarz B

Gegenüber der Methode 1 besitzt die Methode 2 den Vorteil, daß auf dem Objektträger mehrere Proben gleichzeitig untersucht werden können (Abb. 2). Diese antiserumsparende Methode 2 hat jedoch den Nachteil, daß eine Diffusionszeit von 12–16 h erforderlich ist. Durch die Anordnung des Antiserumreservoirs bedingt, kommt bei LP-X-positiven Seren das Präzipitationsband als schräg verlaufende Linie zur Darstellung. Die Lage des Präzipitationsbandes kann aus verschiedenen Ursachen stark variieren. Befindet sich das Antiserumreservoir zu nahe an der Auftragsstelle, so finden sich ähnliche Verhältnisse wie bei Methode 1, ist es zu weit entfernt, so ist die Diffusionszeit verlängert. Auch kommt es bei Untersuchung mehrerer Proben auf einem Objektträger dazu, daß die anodisch wandernden Lipoproteine der folgenden Proben teilweise mit dem LP-X-Antiserum reagieren und daher nicht verwertbare Ergebnisse vorliegen können. Gerade bei Methode 2 wirkt sich die Länge der Wanderungsstrecke des LP-X in Abhängigkeit vom Alter der vorgegossenen Agargele entscheidend aus. Bei Untersuchung des selben Serums mit Hilfe verschieden alter Agargele ist zu beobachten, daß die Lage des LP-X-Präzipitationsbandes starken Schwankungen unterliegt. Außerdem kann die kathodische Wanderung des LP-X von Serum zu Serum variieren. Eine ähnliche Beobachtung wurde ebenfalls bei mehr als 3–4 Wochen alten LP-X-positiven Serumproben gemacht, sie zeigen eine Abnahme der kathodischen Wanderung des LP-X. Aus den vorliegenden Tatsachen ist zu ersehen, daß es bei Methode 2 nicht einfach ist, von vornherein die richtige Lage des Antikörperreservoirs festzulegen. Die Mitreaktion der am Start verbliebenen VLDL kann sich hier besonders bei LP-X-negativen Seren, die einen hohen VLDL-Gehalt aufweisen, störend bemerkbar machen und einen positiven Befund vortäuschen. Diese Präzipitationslinie ist in Abbildung 2 bei Serum Nr. 4 nahe der Auftragsstelle als zweite Linie sichtbar. In der Abbildung 3 werden die durch Methode 3 erhaltenen Resultate wiedergegeben. Das LP-X kann nach der elektrophoretischen Trennung mit dieser Technik bereits innerhalb eines Zeitraumes von 10 min bis 3 h dargestellt werden. Die Zeit, die zur Präzipitation des LP-X notwendig ist, weist eine direkte

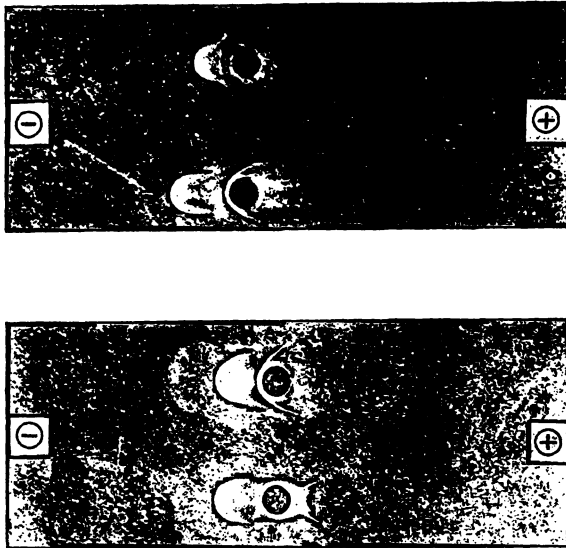


Abb. 3

Ergebnisse der Untersuchung verschiedener LP-X-positiver Sera mit Hilfe der Methode 3. Der LP-X-Gehalt aller 4 Sera war über 200 mg/100 ml Serum. Die Aufnahme wurde im diffusen Streulicht angefertigt

Beziehung zur Höhe der LP-X-Konzentration im Serum auf. Mit Methode 3 stellt sich das LP-X 1–5 mm von der Auftragsstelle entfernt als Fleck dar. Er ist kathodisch durch einen scharfen Bogen begrenzt. Bei höheren LP-X-Konzentrationen tritt noch zusätzlich in Richtung Auftragsstelle ein diffuser weißgrauer Schleier auf, der bei Betrachtung der Immunoelktrophorese im Streulicht gut wahrnehmbar ist. Es hat sich auch bei Methode 3 gezeigt, daß nach einer mehr als 3 h dauernden Diffusion am Start verbliebene Lipoproteine infolge ihres Apolipoprotein-C-Peptidgehaltes einen zusätzlichen Präzipitationsbogen bilden können. Er ist nicht LP-X-spezifisch, denn auch sicher LP-X-negative Seren können dieses Präzipitat aufweisen. Dieses ebenfalls bogenförmige Präzipitat hat immer einen größeren Krümmungsradius als das LP-X-Präzipitat und findet sich konstant in unmittelbarer Nähe der Auftragsstelle (Abb. 3, Serum Nr. 2 und 3). Nach unseren Ergebnissen verfügt die Methode 3 gegenüber den beiden anderen Verfahren über einige wesentlichen Vorteile. Erstens erwies sie sich als die empfindlichste Nachweismethode für ein im Serum vorhandenes LP-X. Unter Verwendung vorgegossener Agargele ergab die Methode 1 noch ein gut sichtbares Präzipitat bei einem LP-X-Gehalt von 25 mg/100 ml Serum. Die Methode 3 hingegen lieferte noch bei einem LP-X-Gehalt von 15 mg/100 ml Serum ein eindeutig positives Resultat. Durch Anfärben der Immunoelktrophorese mit Sudanschwarz läßt sich der Nachweis mit LP-X mit Methode 3 noch um den Faktor 2 empfindlicher gestalten. Mit einem guten LP-X-Antiserum läßt sich demnach unter Verwendung der Methode 3 noch eindeutig der Nachweis von etwa 10 mg LP-X/100 ml Serum erbringen. Zweitens bietet die Methode 3 den Vorteil, daß mit ihr innerhalb kürzester Zeit (10 min–3 h) nach der elektropho-

retischen Trennung gegenüber den beiden anderen Methoden, die eine 12–16 stündige Diffusionszeit benötigen, ein Resultat erhalten werden kann.

### Diskussion

Es bestehen kaum noch Zweifel, daß dem LP-X-Nachweis in der Differentialdiagnostik des Ikterus eine besondere Rolle zukommt (16). Gegenüber den anderen cholestaseanzeigenden Parametern kommt ihm zumindest eine gleich gute Aussage zu (17). Die Erwartung, durch seine Hilfe die Differentialdiagnose des intra- bzw. extrahepatisch bedingten Ikterus zu ermöglichen, hat sich trotz Anwendung weiterer Methoden, wie Bestimmung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität (17), bis jetzt nicht bestätigt; aber schon der sichere Nachweis oder Ausschluß einer Cholestase, den der immunologische LP-X-Test ermöglicht, ist von großer diagnostischer Bedeutung (18).

Das gemeinsame Vorkommen von Apolipoprotein C im LP-X und in physiologischen Lipoproteinen erschwert den immunologischen Nachweis des LP-X und kann positive Resultate vortäuschen. Einzig die kathodische Wanderung des LP-X auf dem Trägermaterial Agar gestattet eine sichere immunologische

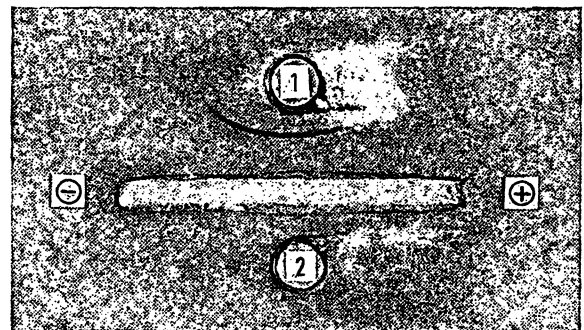


Abb. 4

Agarimmunoelktrophorese eines LP-X-positiven und eines LP-X-negativen Serums nach Methode 1. Das LP-X zeigt nur eine schwach kathodische Wanderung. 1: LP-X-positives Serum, 2: Normalserum, Schlitz: Anti-LP-X

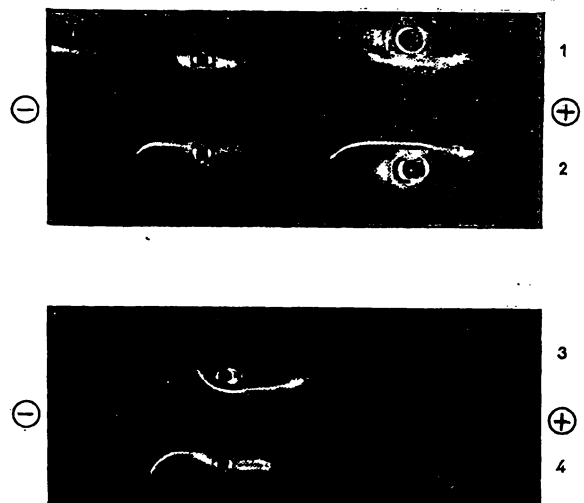


Abb. 5

Immunoelktrophorese vier LP-X-positiver Sera mit unterschiedlicher kathodischer Wanderung im 1proz. Agargel nach Methode 1. Die Aufnahme wurde im diffusen Streulicht aufgenommen

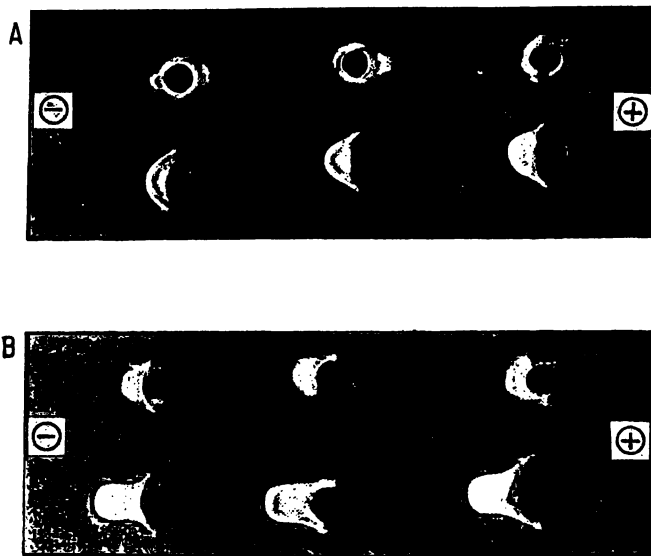


Abb. 6

Unterschiedliche Wanderung zweier LP-X-positiver Sera unter Verwendung einer frisch gegossenen Agarplatte (A) und einer über Nacht gelagerten Agarplatte (B) nach Methode 3. Die horizontale Reihe enthält jeweils das selbe LP-X-positive Serum. Die Aufnahme wurde im diffusen Streulicht angefertigt

LP-X-Bestimmung. Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine optimale Trennung des LP-X von den anderen Lipoproteinen nur dann erreicht werden kann, wenn die Front des durch Gallenfarbstoffe gelb gefärbten Albumins sich mindestens 12–15 mm weit anodisch befindet. Unter diesen Bedingungen kann angenommen werden, daß das LP-X genügend weit kathodisch von der Auftragsstelle liegt und sich von den bei der Immunodiffusion mitreagierenden anderen Lipoproteinen abgetrennt hat. Eine klare Trennung des LP-X konnte unter den von uns gewählten Bedingungen nur dadurch erzielt werden, daß ausschließlich Difco-Bacto-Agar verwendet wurde. Weiters hat sich die Lagerung von vorgegossenen Agargelen als vorteilhaft erwiesen. Durch diese Maßnahme wird die kathodische Wanderung des LP-X verbessert (Abb. 6).

Für die elektrophoretische Trennung können systemabhängige Angaben, wie Spannung und Stromstärke, nur in weiten Grenzen als verbindliche Größen angesehen werden. Sie sind abhängig vom verwendeten Trennsystem, von der Qualität der Gleichstromquelle, von der Art und Menge des verwendeten Puffers, von Temperaturänderungen im Gel während der Elektrophorese und anderen Faktoren. Gibt man aber als Maß für die notwendige Trennzeit bzw. Länge der Trennstrecke die Wanderungstrecke des Albumins an, so lassen sich auch bei Verwendung verschiedener Trennsysteme gleich gute Resultate erzielen.

Aus noch nicht bekannten Gründen tritt in manchen ikterischen Seren ein LP-X auf, welches keine oder nur eine sehr geringe kathodische Wanderung zeigt (Abb. 4). Ein solches LP-X kann jedoch eindeutig mit Methode 1 unter Verwendung einer Negativkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 5). Es erscheint daher wenig sinnvoll, beim LP-X-Test eine Positivkontrolle mitlaufen zu lassen, da bei Verwendung stark kathodisch wandernder Positivkontrollen fälschlich negative Re-

sultate erhoben werden. In allen diesen Fällen führt nur Methode 1 zu einem sicheren Nachweis.

Eine weitere Ursache für eine Fehlinterpretation kann das Einfrieren einer Serum- oder Plasmaprobe sein. Ein Einfrieren der Probe ist auf jeden Fall zu vermeiden, da dadurch die Wanderungseigenschaften des LP-X verändert werden können. Ein ähnliches Verhalten zeigen sehr alte LP-X-positive Sera trotz Zugabe von Natriumazid. Das hohe Molekulargewicht des LP-X macht es notwendig, daß der Antiserumtrog bei Methode 1 nicht weiter als 3 mm von der Auftragsstelle entfernt gestanzt wird, da ansonsten mit längeren Diffusionszeiten zu rechnen ist und Sera mit einem sehr niederen LP-X-Gehalt kein positives Resultat zeigen. Obwohl die meisten LP-X-positiven Sera ikterisch sind und einen Bilirubinspiegel von 50 mg/l und mehr besitzen, gibt es auch Sera, deren Bilirubinwerte nur gering über die Norm erhöht sind und die dennoch LP-X-positiv sind.

Da die Erzeugung eines Antiserums, das nur Apolipoprotein C spezifisch ist, relativ aufwendig ist, muß in den meisten Fällen mit dem gleichzeitigen Auftreten von Antikörpern gegen IgG und Albumin und Lipoprotein B gerechnet werden. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen IgG und Albumin kann aber unter Umständen Anlaß zu Fehlinterpretationen geben, da das IgG auch kathodisch wandert und das Präzipitationsband des Albumins z. B. bei Methode 1 bis in den kathodischen Teil der Immunoelktrophorese reichen kann. In diesen Fällen ist es günstiger das Antiserum zu adsorbieren. Antikörper gegen Lipoprotein B wurden aus unseren Antiseren nicht entfernt, da durch ihre Adsorption einerseits eine Titerabschwächung gegen Lipoprotein C verbunden ist, andererseits Antikörper gegen Lipoprotein B kaum zu Fehlinterpretationen Anlaß geben.

Wegen der Mitreaktion der am Start verbliebenen VLDL hat es sich als Vorteil erwiesen, immer ein sicher LP-X-negatives Serum mit zu untersuchen. Die Präzipitationslinie der VLDL, die sich knapp kathodisch an der Auftragsstelle findet und bei positiven und negativen Sera auftreten kann, ergibt sich durch die Reaktion des Antiserums mit normalen Serumlipoproteinen und stellt kein LP-X dar.

Der Vergleich der drei beschriebenen Methoden zeigt, daß in der Regel mit der Methode 3 in bezug auf Empfindlichkeit die besten Ergebnisse zu erzielen sind. Auch kann mit ihrer Hilfe am schnellsten ein Resultat erhalten werden. In nur wenigen Ausnahmen lieferte Methode 3 fälschlich negative Resultate. Aus diesem Grunde sollte in zweifelhaften Fällen sowohl Methode 3 als auch 1 eingesetzt werden. Methode 2 scheint wegen des Zeitaufwandes und der häufig auftretenden nicht verwertbaren Ergebnisse nicht empfehlenswert zu sein.

Der Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Österreichische Nationalbank haben unsere Arbeit durch die Anschaffung von Apparaten unterstützt, wofür auch an dieser Stelle gedankt wird.

## Literatur

1. JIRGL, V. (1957), *Klin. Wochenschr.* 35, 938. — 2. KUNKEL, H. G. & SLATER, R. J. (1952), *J. Clin. Invest.* 31, 677—684. — 3. EDER, H. A. & RUSS, E. M. (1953), *J. Clin. Invest.* 32, 564. — 4. PICARD, J. & VEISSIERE, D. (1970), *Clin. Chim. Acta* 30, 149—155. — 5. SWITZER, S. & SATENSTEIN, L. (1967), *J. Clin. Invest.* 46, 1855—1866. — 6. SEIDEL, D., ALAUPÖVIC, P. & FURMAN, R. H. (1969), *J. Clin. Invest.* 48, 1211—1223. — 7. SEIDEL, D., SCHMITT, E. A. & ALAUPOVIC, P. (1970), *Deut. Med. Wochenschr.* 95, 1805—1809. — 8. TORSVIK, H., BERG, K., MAGNANI, H. N., MCCONATHY, J., ALAPOVIC, P. & GJONE, E. (1972), *FEBS Letters* 24, 165—168. — 9. SEIDEL, D., GRETZ, H. & RUPPERT, C. (1973), *Clin. Chem.* 19, 86—91. — 10. ALAPOVIC, P., SEIDEL, D., MCCONATHY, W. J. & FURMAN, R. H. (1969), *FEBS Letters* 4, 113—116. — 11. SEIDEL, D., AGOSTINI, B. & MÜLLER, P. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 260, 146—152. — 12. SEIDEL, D. (1971), *Clin. Chim. Acta* 31, 225—229. — 13. SEIDEL, D. & ALAPOVIC, P. (1970), *Deut. Med. Wochenschr.* 95, 1774—1780. — 14. SCHEIDEGGER, J. J. (1955), *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 7, 103—110. — 15. SEIDEL, D., ALAPOVIC, P., FURMAN, R. H. & MCCONATHY, W. J. (1970), *J. Clin. Invest.* 49, 2396—2406. — 16. SEIDEL, D., GRETEN, H., GEISEN, H. P., WENGELER, H. & WIELAND, H. (1972), *Europ. J. Clin. Invest.* 2, 359—364. — 17. WENGELER, H., GRETEN, H. & SEIDEL, D. (1972), *Europ. J. Clin. Invest.* 2, 372—378. — 18. PREXL, H. J. & PETEK, W. (1973), *Der Chirurg*, im Druck.

Prof. Dr. A. Holasek  
A-8010 Graz  
Universitätsplatz 2